

氏 名	呉 白乙拉
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	農 学
学位授与番号	博甲第5174号
学位授与の日付	平成27年 3月25日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Culture-dependent and culture-independent analysis of microbiota associated with anaerobic storage and aerobic deterioration of alfalfa silage (培養法および非培養法によるアルファルファサイレージの嫌氣的貯蔵および好氣的変敗に関わる微生物フローラの解析)
論文審査委員	准教授 西野 直樹 教授 宮本 拓 教授 舟橋 弘晃

学位論文内容の要旨

Understanding of silage microbiota is important for better management and hygiene control. In this study, laboratory-scale ensiling and practical survey were conducted to understand microbiota involved in the anaerobic storage and aerobic deterioration of alfalfa silage. Plate-culture and culture-independent denaturing gradient gel electrophoresis analysis was employed to identify conventional and non-conventional silage bacteria.

In the first step, two laboratory-scale experiments were made using direct-cut and wilted alfalfa silage. Silage was prepared with and without addition of molasses (M), homo-fermentative lactic acid bacteria (LAB) inoculant (*Lactobacillus rhamnosus*, L), or M+L. Additives were used to attenuate aerobic stability after silo opening. Both direct-cut and wilted silages had lactic acid as the predominant fermentation product, whereas acetic acid content in direct-cut silage increased due to long storage. No spoilage was seen in long-stored silage regardless of additive use, whereas short-stored wilted silage deteriorated after exposure to air. As LAB species involved in the high aerobic stability of alfalfa silage, *Lactobacillus buchneri*, *Weissella cibaria*, and *Lactobacillus sakei* were suggested.

Secondly, two follow-up laboratory-scale experiments were performed. Wilted alfalfa silage was prepared with and without M addition, and details of fermentation products and microbiota changes were examined 1, 3, 5 and 7 days after silo opening. Untreated wilted silage resisted deterioration for at least 5 days, even with marginal amount of lactic and acetic acids determined at silo opening. Great improvement of aerobic stability was seen in M-treated silage, with increase of acetic acid content in the presence of air observed. *Lactobacillus fructivorans* was demonstrated to be involved in this stability improvement, and this LAB species was successfully isolated by plate-culture using liver infusion sake medium. Subsequently, inoculation experiment was made using wilted Italian ryegrass (IR) and whole crop corn (WC). Improvement of aerobic stability was found for wilted IR silage at 10^4 cfu/g inoculation level, whereas benefits of *L. fructivorans* were marginal in WC silage even at 10^6 cfu/g inoculation level.

For the third step, a practical survey was performed. Silage samples were collected from 2 large-scale farms in China; one of these farms used stack silos and the other used bunker silos. *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides*, and *Pediococcus pentosaceus* were found in large-scale alfalfa silage.

Despite of the objective to identify bacteria associated with ensiling fermentation and spoilage inhibition, few straightforward results were demonstrated in this study. However, integration of culture-dependent and culture-independent microbiota analysis enabled detection of *L. fructivorans* and evaluation of its roles in fermentation and aerobic stability. Research is worth continuing to clarify substance(s) produced with combination of alfalfa substrate and growth of the identified and yet unidentified bacteria.

論文審査結果の要旨

本研究は、アルファルファサイレージ（発酵飼料）の嫌氣的貯蔵および好氣的変敗に関わる細菌フローラについて、非培養法の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法と培養法を組み合わせで調査したものである。マメ科牧草はサイレージ調製が難しいとされているが、発酵の良否に関わらず開封後の好氣的変敗は起こりにくい。これらに関わる細菌フローラを明らかにし、高い貯蔵性と変敗防止を達成する、新しいサイレージ調製法の提示を目的とした。モデルサイロと実規模サイロを対象とした実験を行い、以下のようない知見を得た。

予乾（材料の低水分化）、糖蜜添加および*L. rhamnosus*添加で開封後に変敗しやすいサイレージとしても、長期貯蔵したアルファルファサイレージは変敗しなかった。発酵が不十分な短期貯蔵では好氣的変敗が確認され、細菌フローラの比較から変敗抑制に関わる乳酸菌として*W. cibaria*と*L. sakei*を同定した。また、糖蜜添加したサイレージで、開封後に酢酸が増加するという他草種にはない変化が見られた。

続く実験において、変敗抑制と開封後の酢酸増加に関わる乳酸菌の分離を試みた。しかし、培養法および非培養法のいずれでも*W. cibaria*と*L. sakei*は確認できず、それらに代わる微生物因子として*L. fructivorans*が同定された。培地の工夫で*L. fructivorans*を分離することができたため、イネ科牧草とトウモロコシに添加してその変敗抑制能を評価した。*L. fructivorans*は両草種で変敗を抑制したが、マメ科牧草の安定性を説明できるほど強力なものではなかった。

モデルサイロを用いた上記の実験では、材料や調製年度によって細菌フローラが大きく変動した。実態調査が必要と考えられたため、大規模酪農家を訪問して実規模サイロのサンプリングを行った。*W. cibaria*、*L. sakei*、*L. fructivorans*は非培養法でも確認することができず、マメ科牧草の安定性をあえる種の細菌フローラで説明することは困難と結論した。

新しい調製法の提示という当初の目的は達成できなかったが、非培養法と培養法の組み合わせが、飼料微生物の制御および機能解析に有用であることを明確に示した。*L. fructivorans*をサイレージから分離したのも初めてであり、モデル実験と実態調査をともに行った点も評価できる。よって、呉 白乙拉氏は環境生命科学研究科の博士（農学）の学位を受ける資格があるものと判断した。